



## ИНСТРУКЦИЯ

### по применению Набора реагентов для определения активности нефракционированного гепарина (Ренапарин-НФГ-тест).

#### НАЗНАЧЕНИЕ

Набор реагентов для определения активности нефракционированного гепарина (далее Набор) предназначен для количественного определения анти Ха и анти Ха активности в препаратах и субстанциях нефракционированного гепарина (НФГ) методом с хромогенными субстратами. Тесты ингибирования активности факторов Ха и Ха являются наиболее чувствительными и информативными для определения активности НФГ.

#### ХАРАКТЕРИСТИКА НАБОРА

##### Принцип действия

Метод определения активности НФГ основан на способности комплекса антитромбин III-гепарин (АТIII-НМГ) нейтрализовать активированные факторы Ха и Ха. Активность НФГ в препаратах и субстанциях определяют, добавляя к ним избыток антитромбина III и фактора Ха или Ха. При этом происходит ингибирование факторов Ха или Ха комплексом АТIII-НФГ пропорционально количеству НФГ в препарате или субстанции. Оставшееся количество фактора Ха или Ха катализирует отщепление пара-нитроанилина (pNA) от синтетических хромогенных субстратов. Абсорбция свободного pNA, определяемая при 405 нм, обратно пропорциональна анти Ха или анти Ха активностям НФГ.

Процесс идет по следующим схемам:

1. При определении анти Ха активности НФГ АТIII (избыток) + НФГ  $\Rightarrow$  АТIII-НФГ. АТIII-НФГ + Ха (избыток)  $\Rightarrow$  АТIII-НФГ-Ха+Ха (остаток). Ха (остаток) + ХаСубстрат-pNA  $\Rightarrow$  Пептид + pNA.
2. При определении анти Ха активности НФГ АТIII (избыток) + НФГ  $\Rightarrow$  АТIII-НФГ. АТIII-НФГ + Ха (избыток)  $\Rightarrow$  АТIII-НФГ-Ха+Ха (остаток). Ха (остаток) + ХаСубстрат-pNA  $\Rightarrow$  Пептид + pNA.

##### Состав набора

В состав набора входят следующие компоненты:

1. Антитромбин III (1 МЕ/фл), лиофильно высушенный для антиХа – 1 флакон.
2. Антитромбин III (1 МЕ/фл), лиофильно высушенный для антиХа – 2 флакона.
3. Фактор Ха (34 нкат/фл), лиофильно высушенный – 1 флакон.
4. Тромбин (фактор Ха) (20 МЕ/фл), лиофильно высушенный – 1 флакон.
5. Хромогенный субстрат для фактора Ха, 3 мкМ/флакон, лиофильно высушенный флакона. – 2
6. Хромогенный субстрат для тромбина, 3 мкМ/флакон, лиофильно высушенный флакона. – 2
7. Рабочий Стандартный Образец НФГ – 1 флакон
8. Буферный раствор концентрированный (5 мл) – 1 флакон
9. Бычий сывороточный альбумин (1 г) – 1 флакон.

#### АНАЛИТИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Диапазон определяемых значений анти Ха активности НФГ составляет 0,1 - 0,4 МЕ/мл. Диапазон определяемых значений анти Ха активности НФГ составляет 0,02 - 0,1 МЕ/мл. Коэффициент вариации результатов определения анти Ха и анти Ха активности НМГ - не более 10%.

Чувствительность метода определения анти Ха активности - 0,01 антиХа ед/мл.

Чувствительность метода определения анти Ха активности - 0,01 антиХа ед/мл.

Допустимый разброс результатов при использовании разных наборов одной серии - не более 10%.

#### МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- 4.1. Потенциальный риск применения набора – класс 2а.
- 4.2. При работе с набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, т.к. антитромбин III, фактор Ха и тромбин получены из плазмы крови человека, которую следует рассматривать как потенциально инфицированную, способную длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.
- 4.3. Меры предосторожности при работе с набором – соблюдение «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

#### ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

- сканирующий спектрофотометр для прочтения 96 луночных планшетов типа Multiscan EX или равноценный;
- термостат для 96 луночных планшетов;
- рН-метр милливольтметр типа рН 340 или равноценный;
- весы аналитические;
- мешалка лабораторная типа Вортекс;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 50мкл; от 20 до 200мкл; от 200 до 1000мкл типа Ленпипет или равноценные;
- пипетки полуавтоматические многоканальные переменного объема, позволяющие отбирать объемы жидкости от 5 до 50мкл и от 20 до 200мкл типа Ленпипет или равноценные;
- мерная колба объемом 10мл класс точности 1-100-2 (ГОСТ 1770-74 Е);
- мерная колба объемом 25мл класс точности 1-100-2 (ГОСТ 1770-74 Е);
- мерная колба объемом 100мл класс точности 1-100-2 (ГОСТ 1770-74 Е);
- мерная колба объемом 250мл класс точности 1-100-2 (ГОСТ 1770-74 Е);
- пластиковые пробирки с крышками типа эппендорф объемом 1,5мл;
- пластиковые пробирки с крышками объемом 10мл;
- вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72);
- кислота уксусная ледяная – хч;
- перчатки резиновые хирургические (ГОСТ 3-88);

#### АНАЛИЗИРУЕМЫЕ ОБРАЗЦЫ

Для анализа используют готовую лекарственную форму препарата НФГ или субстанцию НФГ, разведенную буфером для разведения образцов до активности приблизительно 0.2антиХа ед/мл и 0,05антиХа ед/мл.

#### ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

##### Приготовление реагентов

##### Рабочий буферный раствор.

Буферный раствор концентрированный (5 мл) перенести в мерный стакан вместимостью 100 мл и долить дистиллированной водой до 80 мл, затем при перемешивании количественно перенести из флакона бычий сывороточный альбумин и тщательно перемешать до растворения. Довести объем до 100 мл дистиллированной водой и перемешать. рН рабочего буферного раствора 7,40±0,05. Рабочий буферный раствор хранить при температуре +2-8°C не более 7 дней.

##### 70% раствор кислоты уксусной.

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 70 мл кислоты уксусной ледяной (хч), доводят объем раствора водой объем до метки и перемешивают. Раствор хранят при комнатной температуре в течение 3 месяцев.

##### Раствор антитромбина III для определения антиХа активности.

Во флакон с лиофильно высушенным АТ III внести 1,0 мл рабочего буферного раствора и растворить содержимое при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 15 минут после разведения.

##### Раствор антитромбина III для определения антиХа активности.

Во флакон с лиофильно высушенным АТ III внести 2,0 мл рабочего буферного раствора и растворить содержимое при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 15 минут после разведения.

##### Раствор тромбина.

Во флакон с лиофильно высушенным тромбином внести 9,0 мл рабочего буферного раствора, растворить при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 15 минут после разведения.

##### Раствор фактора Ха.

Во флакон с лиофильно высушенным фактором Ха внести 6,0 мл рабочего буферного раствора, растворить при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 15 минут после разведения.

##### Раствор хромогенного субстрата для фактора Ха.

Во флакон с хромогенным субстратом для фактора Ха внести 6,0 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 15 минут после разведения.

##### Раствор хромогенного субстрата для тромбина.

Во флакон с хромогенным субстратом для тромбина внести 6,0 мл дистиллированной воды, растворить при осторожном покачивании. Реагент готов к проведению анализа через 15 минут после разведения.

##### Раствор Рабочего Стандартного Образца НФГ.

Во флакон с Рабочим Стандартным Образцом нефракционированного гепарина внести 1мл дистиллированной воды и растворить при осторожном покачивании. В результате получают раствор с антиХа и антиХа активностями, указанными в паспорте на набор. Реагент готов к проведению анализа через 15 минут после разведения.

##### Стабильность реагентов

Реагенты	2-8°C	18-22°C	-40°C
Раствор антитромбина III	3 суток	1 сутки	6 месяцев
Раствор фактора Ха	3 суток	1 сутки	6 месяцев
Раствор тромбина	3 суток	1 сутки	6 месяцев
Растворы хромогенных субстратов	10 суток	2 суток	6 месяцев
Рабочий буферный раствор	7 суток	8 часов	-
70% раствор кислоты уксусной	-	3 месяца	-

#### Приготовление серии разведений Рабочего Стандартного Образца нефракционированного гепарина.

В микропробирку вносят точно 1,8 мл рабочего буферного раствора и 0,2 мл раствора РСО НФГ и перемешивают (раствор препарата сравнения S<sub>1</sub>).

1 мл раствора S<sub>1</sub> помещают в микропробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора и перемешивают (раствор препарата сравнения S<sub>2</sub>).

1 мл раствора S<sub>2</sub> помещают в микропробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора и перемешивают (раствор препарата сравнения S<sub>3</sub>).

1 мл раствора S<sub>3</sub> помещают в микропробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора и перемешивают (раствор препарата сравнения S<sub>4</sub>).

1 мл раствора S<sub>4</sub> помещают в микропробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора и перемешивают (раствор препарата сравнения S<sub>5</sub>).

1 мл раствора S<sub>5</sub> помещают в микропробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора и перемешивают (раствор препарата сравнения S<sub>6</sub>).

АнтиХа и антиХа активности в растворах препаратов сравнения S<sub>1</sub> – S<sub>6</sub> указаны в паспорте на набор.

Растворы S<sub>1</sub> – S<sub>6</sub> используют сразу после приготовления.

#### Приготовление серии разведений испытуемого препарата нефракционированного гепарина для определения анти Ха и антиХа активности.

В мерную колбу объемом 25 мл вносят около 24 мл дистиллированной воды, 100 мкл исследуемого препарата, перемешивают и доводят дистиллированной водой до метки (раствора 1).

В микропробирку вместимостью 3 мл вносят 1,8 мл буферного раствора, добавляют 200 мкл раствора 1 и перемешивают (раствор 2);

В микропробирку вместимостью 3 мл вносят 1,8 мл буферного раствора, добавляют 200 мкл раствора 2 и перемешивают (раствор испытуемой субстанции T<sub>1</sub>, рассчитанная активность около 0,2 МЕ/мл);

1 мл раствора T<sub>1</sub> помещают в микропробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора и перемешивают (раствор T<sub>2</sub>);

1 мл раствора T<sub>2</sub> помещают в микропробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора с и перемешивают (раствор T<sub>3</sub>);

1 мл раствора Т<sub>3</sub> помещают в микропробирку, вместимостью 1,5 мл. Добавляют 0,5 мл буферного раствора и перемешивают (раствор Т<sub>4</sub>)  
Растворы Т<sub>1</sub> – Т<sub>4</sub> используют сразу после приготовления.

#### Ход анализа при определении антиХа и антиIIа активности НФГ.

Определение проводят в полистирольных планшетах, помещая их в термощейкере при 37°С.

- С помощью многоканальной пипетки, вносят по 20 мкл раствора антитромбина III для определения антиХа либо антиIIа активности последовательно во 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-й ряды лунок планшета.
- С помощью одноканальной пипетки буферный раствор для определения холостой амидолитической активности (В), соответствующего разведения стандартного образца нефракционированного гепарина (S<sub>1</sub> – S<sub>2</sub>) и образца испытуемого препарата (Т<sub>1</sub> – Т<sub>4</sub>) вносят в объеме 20 мкл согласно схеме распределения, представленной в нижеследующей таблице №1.

Ряд	Номер лунки в ряду												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A		B	S <sub>2</sub>	S <sub>4</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>3</sub>							
B		B	S <sub>2</sub>	S <sub>4</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>3</sub>							
C		B	S <sub>2</sub>	S <sub>4</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>3</sub>							
D		B	S <sub>2</sub>	S <sub>4</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>3</sub>							
E		S <sub>1</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>5</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>4</sub>							
F		S <sub>1</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>5</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>4</sub>							
G		S <sub>1</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>5</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>4</sub>							
H		S <sub>1</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>5</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>4</sub>							

- С помощью многоканальной пипетки во 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-й ряды лунок планшета вносят по 40 мкл раствора фактора Ха и выдерживают в термощейкере при 37 ± 0,5°С по секундомеру 2 мин.
- С помощью многоканальной пипетки во 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-й ряды лунок планшета вносят по 100 мкл раствора соответствующего хромогенного субстрата для фактора Ха либо для фактора IIа и инкубируют ровно 4 мин при 37±0,5°С.
- С помощью многоканальной пипетки во 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-й ряды лунок планшета вносят по 40 мкл 70% раствора кислоты уксусной для остановки реакции. Порядок внесения реактивов представлен в Таблицах 2 и 3.

Таблица 2. Ход анализа при определении антиХа активности НФГ.

Раствор антитромбина III для определения антиХа активности	20 мкл
Образец препарата или стандарта	20 мкл
Раствор фактора Ха	40 мкл
Инкубация при 37°С и перемешивании 2 минуты	
Раствор хромогенного субстрата для фактора Ха	100 мкл
Инкубация при 37°С и перемешивании 4 минуты	
Кислота уксусная	40 мкл

Таблица 3. Ход анализа при определении антиIIа активности НФГ.

Раствор антитромбина III для определения антиIIа активности	20 мкл
Образец препарата или стандарта	20 мкл
Раствор фактора IIа	40 мкл
Инкубация при 37°С и перемешивании 2 минуты	
Раствор хромогенного субстрата для фактора IIа	100 мкл
Инкубация при 37°С и перемешивании 4 минуты	
Кислота уксусная	40 мкл

#### РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Измеряют оптическую плотность растворов при 405 нм с помощью Мультискана EX или аналогичного оборудования.

#### УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ РЕАКЦИИ

##### При определении антиХа активности НФГ

Определяют среднее значение оптических плотностей (ОП) для параллельных проб разведенный стандартного образца нефракционированного гепарина. В программе Microsoft Excel строят график, на котором по оси абсцисс (линейной) откладывают величины, соответствующие оптическим плотностям (ОП), а по оси ординат (логарифмической) – анти Ха активность стандартного образца нефракционированного гепарина. Проводят линию тренда в диапазоне активности 0,05 - 0,4 антиХа ед/мл. Коэффициент корреляции линии тренда не должен быть ниже 0,98.

Используя уравнение линии тренда по средним значениям оптических плотностей рассчитывают анти Ха активность исследуемого препарата с учетом разведений. Результаты расчета активности для каждого разведения исследуемого образца не должны различаться между собой более чем на 10%. В этом случае за активность исследуемого препарата принимается среднее значение активностей, полученных для каждого разведения. В том случае, если для какого-либо разведения полученное значение активности отличается от остальных более чем на 10% его необходимо исключить из расчета среднего значения активности.

##### При определении антиIIа активности НФГ

Определяют среднее значение оптических плотностей (ОП) для параллельных проб разведенный стандартного образца нефракционированного гепарина. В программе Microsoft Excel строят график, на котором по оси абсцисс (линейной) откладывают величины, соответствующие оптическим плотностям (ОП), а по оси ординат (логарифмической) – анти IIа активность стандартного образца низкомолекулярного гепарина. Проводят линию тренда в диапазоне активности 0,05 – 0,4 антиIIа ед/мл. Коэффициент корреляции линии тренда не должен быть ниже 0,98.

Используя уравнение линии тренда по средним значениям оптических плотностей рассчитывают анти IIа активность исследуемого препарата с учетом разведений. Результаты расчета активности для каждого разведения исследуемого образца не должны различаться между собой более чем на 10%. В этом случае за активность исследуемого препарата принимается среднее значение активностей, полученных для каждого разведения. В том случае, если для какого-либо разведения полученное значение активности отличается от остальных более чем на 10% его необходимо исключить из расчета среднего значения активности.

#### УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ТРАНСПОРТИРОВКИ НАБОРА

Срок годности набора – 24 месяца. Не использовать набор после истечения срока годности!

Набор стабилен в течение всего срока годности при условии хранения в закупоренном виде в холодильнике при температуре от плюс 2 до плюс 8°С. Допускается хранение при температуре до плюс 25°С не более 10 суток. Замораживание наборов допускается. Изделия, хранившиеся с нарушением регламентированного режима, применению не подлежат!

Транспортирование наборов должно осуществляться при температуре от плюс 2 до плюс 8°С в термоконтейнерах, содержащих хладоэлементы, или в авторефрижераторах с использованием термондикаторов в соответствии с правилами перевозок, действующими на данном виде транспорта. Допускается транспортирование наборов при температуре до плюс 25°С не более 10 суток. Замораживание допускается.

#### МЕРЫ ПО БЕЗОПАСНОЙ УТИЛИЗАЦИИ ОТХОДОВ

В соответствии с «Санитарно-эпидемиологическими требованиями к обращению с медицинскими отходами» (СанПиН 2.1.7.2790-10 от 12.12.2010) отходы от работы с набором реагентов Ренапарин-тест с использованием образцов плазмы крови пациентов относятся к классу опасности Б.







Отходы собирают в одноразовые пакеты желтого цвета, пакеты заполняют на ¾, завязывают, маркируют надписью: «Отходы. Класс Б», наносят на бирку название организации, дату и ФИО исполнителя и помещают на участок временного хранения до вывоза транспортом специально-подразделения к месту обеззараживания и утилизации.

Наборы реагентов Ренапарин -тест, не подлежащие использованию, и наборы с истекшим сроком годности относятся к отходам класса Г. Сбор и временное хранение отходов класса Г осуществляется в маркированные емкости («Отходы. Класс Г»).

Диагностические средства собираются в одноразовую маркированную упаковку любого цвета (кроме желтого и красного) в соответствии с требованиями нормативных документов в зависимости от класса опасности отходов. Вывоз отходов класса Г для обезвреживания или утилизации осуществляется специализированными организациями, имеющими лицензию на данный вид деятельности. Транспортирование, обезвреживание и захоронение отходов класса Г осуществляется в соответствии с гигиеническими требованиями, предъявляемыми к порядку накопления, транспортирования, обезвреживания и захоронения токсичных промышленных отходов.

Отходы буфера относятся к отходам класса А.

#### СИМВОЛЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ МАРКИРОВКЕ НАБОРА

Символ	Наименование символа
	Номер по каталогу
	Медицинское изделие для диагностики in vitro
	Биологический риск
	Температурный диапазон
	Обратитесь к инструкции по применению
	Изготовитель

Дата утверждения инструкции 05 июля 2010 г.

По вопросам, касающимся качества набора, следует обращаться в НПО «РЕНАМ» МБООИ «Общество больных гемофилией» по адресу: 125167, г. Москва, Нарышкинская аллея, д. 5, стр.2.

тел/факс (495) 225-12-61, (499) 707-76-30, fax (499) 705-12-61, e-mail: info@renam.ru